

記憶喪失性貝毒成分ドウモイ酸によるマウスの自発的 交替行動障害に及ぼすニコチンの改善作用

Effects of Nicotine on Impairment of Spontaneous Alternation Behavior
Induced by Domoic Acid, an Amnesic Shellfish Poison, in Mice

上野 健一

Ken-ichi UENO

Key words : amnesic shellfish poison (記憶喪失性貝毒) ; domoic acid (ドウモイ酸) ; nicotine (ニコチン) ; spontaneous alternation behavior (自発的交替行動) ; mouse (マウス)

ドウモイ酸は、1987年カナダで養殖イガいの摂食により発生した短期記憶喪失を主徴とする食中毒の原因物質である^{1,2)}。記憶喪失性貝毒とも呼ばれるドウモイ酸は、記憶障害や神経細胞死などの神経毒性を誘発するグルタミン酸受容体作動物質（アゴニスト）である。

グルタミン酸は中枢神経系に広汎に分布する主要な興奮性神経伝達物質であり、ほとんどすべての神経細胞がグルタミン酸に対して反応を示す。グルタミン酸受容体は中枢神経における興奮性シナプス伝達の中心的な役割を果たしており、学習・記憶などのシナプス可塑性に関与する。一方、神経細胞が高濃度のグルタミン酸に曝露された際に生じる神経毒性は、種々の神経変性疾患の発症メカニズムに深い関連性を持ち、特に培養大脳皮質ニューロンにおいて細胞をアミロイド β タンパクで前処置することによりグルタミン酸神経毒性が増強されることなど^{3,4)}から、グルタミン酸がアルツハイマー病における神経細胞死の危険因子として作用することが示唆されている。

グルタミン酸、*N*-methyl-D-aspartate 及びカイニン酸などのグルタミン酸受容体アゴニストにより誘発される神経毒性や行動障害は、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) アゴニストのニコチンにより抑制され、ニコチンによる神経保護作用が指摘されている⁵⁻⁸⁾。nAChR は骨格筋、神経節及び中枢神経系に発現するイオンチャネル型受容体であり、神経系の nAChR は α もしくは $\alpha\beta$ の 2 種のサブユニットからなり 5 量体 (α_5 もしくは $\alpha_2\beta_3$ タイプ) を形成している。 α_5 タイプには $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ 及び $\alpha 9$ が、 $\alpha_2\beta_3$ タイプには $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ 及び $\alpha 6\beta 3$ のサブタイプがそれぞれ知られている⁹⁾。ニコチン性アセチルコリン神経系は、注意力や記憶・学習などの認知機能に密接に関連している^{10,11)}。特に、注意力や作業記憶などには nAChR のサブタイプ $\alpha 4\beta 2$ と $\alpha 7$ が重要な役

割を果たしていることが知られている¹²⁻¹⁷⁾。

ラットやマウスなどにドウモイ酸を投与すると、記憶障害や海馬神経細胞死が認められることが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。これらはいずれも記憶障害と神経細胞死の関連性についての病理学的あるいは生化学的研究であり、薬理学的な研究報告は見られない。これまでに、われわれはマウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害がカイニン酸型グルタミン酸受容体拮抗物質（アンタゴニスト）や group II 及び group III 代謝調節型グルタミン酸受容体アゴニストにより予防されることを報告してきた^{21,22)}。グルタミン酸受容体アゴニストによる神経毒性や行動障害がニコチンにより抑制されること、また、ニコチン性アセチルコリン神経系が認知機能に密接に関連していることが知られている^{5-8,10,11)}。しかしながら、ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼすニコチンの作用は未詳であった。

そこで、本研究はマウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼすニコチンの作用を明らかにすることを目的とした。

方 法

1. 実験動物

実験には、6～7 週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC 株）を使用した。動物は、入荷後 1 週間以上、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の明暗サイクル（明期、6:00～18:00）環境下で飼育し、餌及び水は自由に摂取させた。

2. 実験装置

注意力の側面を包含する短期記憶を自発的交替行動により評価した²¹⁾。自発的交替行動の測定には Y 字迷路を使用した。1 本のアームの長さが 40 cm、壁の高さが 12 cm、床の幅が 3 cm、上部の幅が 10 cm で、3 本のアームがそれぞれ 120 度の角度で接続された Y 字迷路を実験室の床の

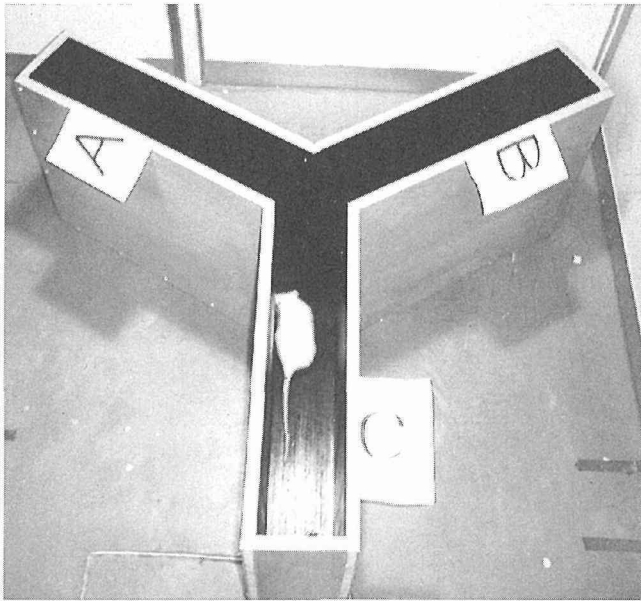


写真1 Experimental Apparatus for Spontaneous Alternation Performance

中央に設置して使用した (写真1)。

3. 実験手順

自発的交替行動の測定は, Sarter *et al.* (1988) の方法に準じて以下の手順で行った²³⁾。マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き, 8分間にわたって迷路内を自由に探索させ, マウスが選択したアームを順に記録した。マウスが測定時間内に各アームを選択した回数を記録し, これを総アーム選択数 (total arm entries) とした。次に, この中から連続して異なる3本のアームを選択した組み合わせを調べ, この数を交替行動数とした。交替行動数を総アーム選択数から2を引いた数で割り, その値に100を掛けて求めた数値を交替行動率 (alternation behavior(%)) とし, これを自発的交替行動の指標とした。

4. 使用薬物と投与方法

ドウモイ酸 (domoic acid, Sigma 社製), ニコチン ((-)-nicotine hydrogen tartrate, Sigma 社製), mecamlamine (MEC; mecamlamine hydrochloride, Sigma 社製), hexamethonium (HEX; hexamethonium dichloride, Sigma 社製), dihydro- β -erythroidine (DH β E; dihydro- β -erythroidine hydrobromide, Sigma-RBI 社製), methyllycaconitine (MLA; methyllycaconitine citrate, Sigma 社製) を使用した。これらの薬物はすべて生理食塩水に溶解した。ドウモイ酸は, 自発的交替行動測定の前24時間前にマウスへ単回腹腔内投与した。ニコチンは, 自発的交替行動測定の前20分前に単回皮下投与した。MEC, HEX, DH β E 及び MLA は, ニコチン投与の10分前に単回腹腔内投与した。対照群には10 mL/kg の0.9%生理食塩水を投与した¹⁷⁾。

5. 統計学的処理

交替行動率及び総アーム選択数は平均値 \pm 標準誤差で表

した。二群間の比較には *t* 検定を用い, 三群以上の比較には, 一元配置分散分析を行い, 有意差が認められたものについては, Dunnett の多重比較検定を行った²⁴⁾。なお, これらの統計処理では, 原則として危険率を5%とした。

結果及び考察

1. マウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼすニコチンの影響

マウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼすニコチンの影響を Fig. 1 に示す。ドウモイ酸 (3 mg/kg) は対照群と比較しマウスの交替行動率を有意に低下させた (Fig. 1A)。これに対し, マウスの総アーム選択数はドウモイ酸による影響は認められなかった (Fig. 1B)。ドウモイ酸による交替行動率の低下はニコチン (0.1 及び 1 mg/kg) により用量依存的かつ有意に改善された (Fig. 1A)。また, 総アーム選択数はニコチンによる影響は認められなかった。

2. ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用に及ぼす nAChR アンタゴニストの影響

ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチン (1 mg/kg) の改善作用に及ぼす nAChR アンタゴニストの影響を Fig. 2 及び 3 に示す。ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は, 中枢作用型非選択的 nAChR アンタゴニスト MEC (1 mg/kg) の前処置により有意に阻害されたが, 末梢作用型 nAChR アンタゴニスト HEX (5 mg/kg) の前処置では阻害されなかった (Fig. 2A)。

また, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は, 選択的 $\alpha 4\beta 2$ nAChR アンタゴニスト DH β E (3 mg/kg) の前処置により有意に阻害されたが, 選択的 $\alpha 7$ nAChR アンタゴニスト MLA (10 mg/kg) の前処置では阻害されなかった (Fig. 3A)。

3. 考 察

ニコチン性アセチルコリン神経系は, 注意力や記憶・学習などの認知機能に密接に関連していることから^{10,11)}, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼすニコチンの影響を検討した。ドウモイ酸による交替行動率の低下は, ニコチンにより用量依存的かつ有意に改善されたことから, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害にはニコチンが有効であることが示唆された。

また, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は, 中枢作用型非選択的 nAChR アンタゴニスト MEC の前処置により有意に阻害されたが, 末梢作用型 nAChR アンタゴニスト HEX の前処置では阻害されなかった。このことから, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は, 中枢 nAChR を介した作用であることが示唆された。

中枢神経系における主要な nAChR は $\alpha 4\beta 2$ nAChR と $\alpha 7$ nAChR のサブタイプに大別されている。グルタミン酸神経毒性に対するニコチンの神経保護作用は $\alpha 4\beta 2$

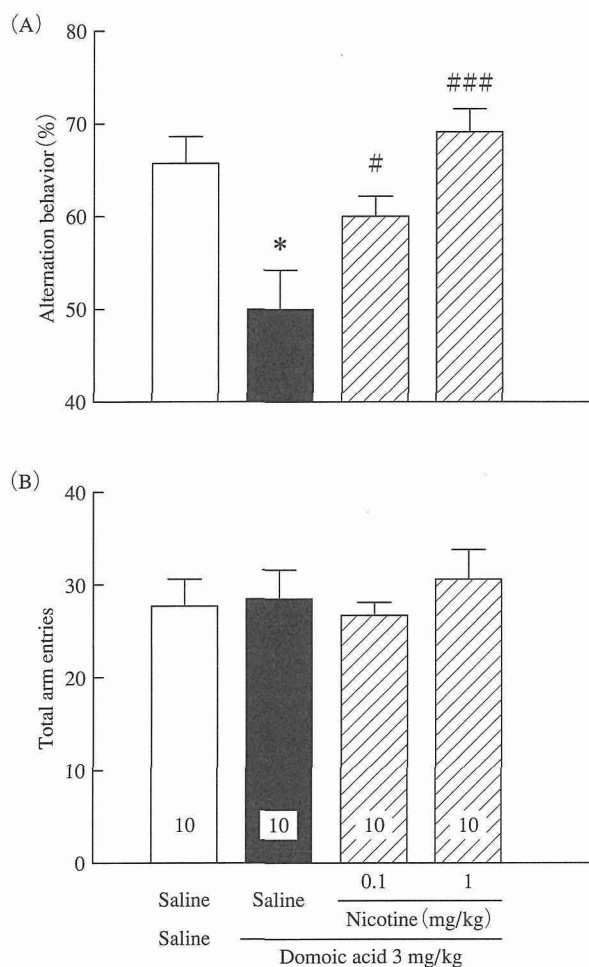


Fig. 1 Effects of Nicotine on Domoic Acid-induced Impairment of Spontaneous Alternation (A) and Total Arm Entries (B) in Mice

Domoic acid (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 hours before the test. Nicotine (0.1–1 mg/kg, s.c.) was administered 20 min before the test. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (vertical bars). The number of mice used are shown in the columns. * $p < 0.01$ vs. saline treated-group; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ vs. domoic acid alone.

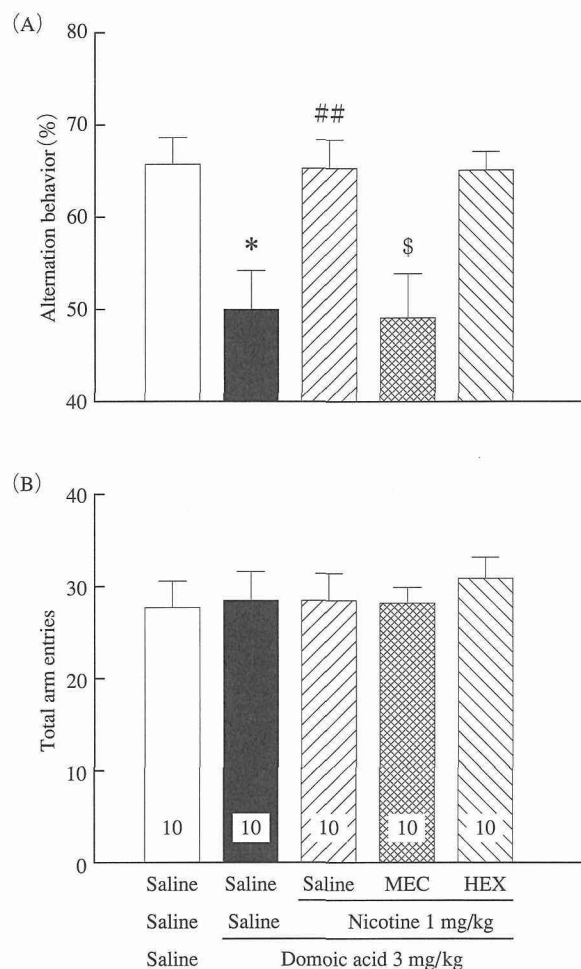


Fig. 2 Effects of Mecamylamine (MEC) and Hexamethonium (HEX) on Nicotine-induced Improvement of Spontaneous Alternation (A) and Total Arm Entries (B) in Mice Treated with Domoic Acid

Domoic acid (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 hours before the test. MEC (1 mg/kg, i.p.) or HEX (5 mg/kg, i.p.) and nicotine (1 mg/kg, s.c.) were administered 30 and 20 min before the test, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (vertical bars). The number of mice used are shown in the columns. * $p < 0.01$ vs. saline treated-group; ## $p < 0.01$ vs. domoic acid alone; \$ $p < 0.05$ vs. nicotine alone.

nACR アンタゴニストと $\alpha 7$ nAChR アンタゴニストの両者により部分的に阻害されることから、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR と $\alpha 7$ nAChR の 2 種類の中枢型 nAChR がニコチンの神経保護作用に関与すると推定されている^{25,26}。ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は、選択的 $\alpha 4\beta 2$ nAChR アンタゴニスト DH β E の前処置により有意に阻害されたが、選択的 $\alpha 7$ nAChR アンタゴニスト MLA の前処置では阻害されなかった。このことから、ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介した作用であることが示唆された。

ニコチンは、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介して注意機能障害や短期記憶障害を改善することが報告されている^{15–17}。また、ニコチンは $\alpha 7$ nAChR を介して学習・記憶障害（長期記憶障害）を改善すること¹³や学習・記憶の電気生理学的

基盤と考えられている海馬長期増強現象を増強すること²⁷が報告されている。海馬において $\alpha 7$ nAChR は興奮性グルタミン酸神経の神経終末に、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR はアセチルコリン神経の神経終末に存在することが知られている^{28,29}。ドウモイ酸により海馬グルタミン酸神経の神経終末の $\alpha 7$ nAChR が障害され、代償的にアセチルコリン神経の神経終末に存在する $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介してニコチンが改善効果を示したと推察される。

本研究において、ニコチンが $\alpha 7$ nAChR ではなく $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介してドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害を改善したという結果は、上記の報告^{15–17}と一致する。これは、ニコチンが $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介してドウモイ酸処置マウスの注意機能を改善し、注意力の側面を包含す

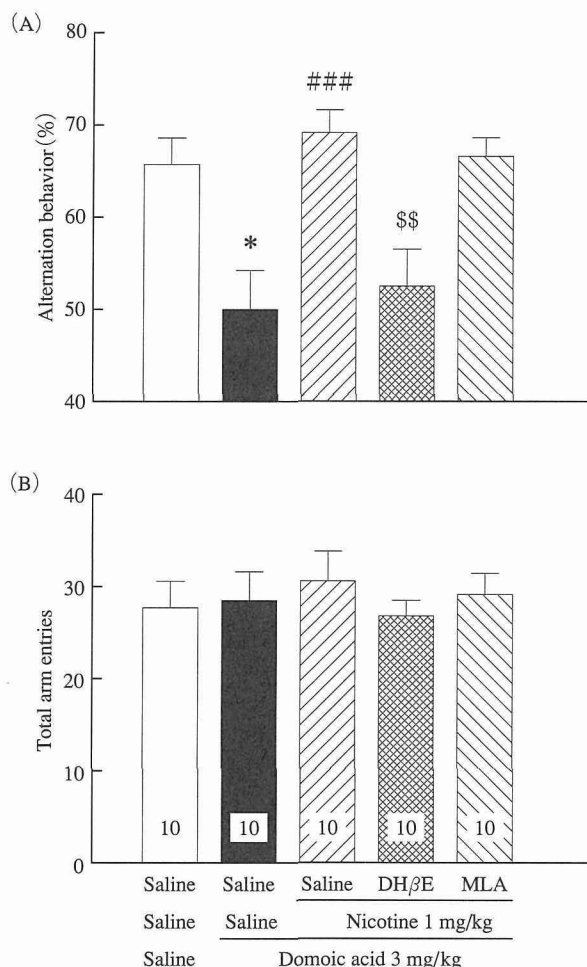


Fig. 3 Effects of Dihydro- β -erythroidine (DH β E) and Methyllycaconitine (MLA) on Nicotine-induced Improvement of Spontaneous Alternation (A) and Total Arm Entries (B) in Mice Treated with Domoic Acid

Domoic acid (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 hours before the test. DH β E (3 mg/kg, i.p.) or MLA (10 mg/kg, i.p.) and nicotine (1 mg/kg, s.c.) were administered 30 and 20 min before the test, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (vertical bars). The number of mice used are shown in the columns. * $p < 0.01$ vs. saline treated-group; ### $p < 0.001$ vs. domoic acid alone; \$\$ $p < 0.01$ vs. nicotine alone.

る短期記憶の情報処理効率が向上した結果、ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害が改善されたものと考えられる。

以上より、ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害におけるニコチンの改善作用は、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 活性化機構が主要メカニズムであることが推察された。

本研究は、平成 17 年度より開始された一般試験研究「道産貝類の安全性に関する調査研究」の一環として行われたことを付記する。

文 献

- 1) Perl TM, Bedard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS : N. Engl. J. Med., 322, 1775 (1990)
- 2) Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjedde A, Cashman NR : N. Engl. J. Med., 322, 1781 (1990)
- 3) Koh J-Y, Yang LL, Cotman CW : Brain Res., 553, 315 (1990)
- 4) Le WD, Comlon LV, Xie WJ, Smith RG, Alexianu M, Appel SH : Brain Res., 686, 49 (1995)
- 5) Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Shimohama S, Kimura J : Brain Res., 644, 181 (1994)
- 6) Borlongan CV, Shytle RD, Ross SD, Shimizu T, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR : Exp. Neurol., 136, 261 (1995)
- 7) O'Neill AB, Morgan SJ, Brioni JD : Neurobiol. Learn. Mem., 69, 46 (1998)
- 8) Kim HC, Jhoo WK, Ko KH, Kim WK, Bing G, Kwon MS, Shin EJ, Suh JH, Lee YG, Lee DW : Life Sci., 66, 317 (2000)
- 9) Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux J-P : Trends Pharmacol. Sci., 21, 211 (2000)
- 10) Levin ED, Simon BB : Psychopharmacology, 138, 217 (1998)
- 11) Rezvani AH, Levin ED : Biol. Psychiatry, 49, 258 (2001)
- 12) Felix R, Levin ED : Neuroscience, 81, 1009 (1997)
- 13) Levin ED, Bettgeowda C, Blosser J, Gordon J : Behav. Pharmacol., 10, 675 (1999)
- 14) Bancroft A, Levin ED : Neuropharmacology, 39, 2770 (2000)
- 15) Blondel A, Sanger DJ, Moser PC : Psychopharmacology, 149, 293 (2000)
- 16) Grottick AJ, Higgins GA : Behav. Brain Res., 117, 197 (2000)
- 17) Ueno K, Togashi H, Matsumoto M, Ohashi S, Saito H, Yoshioka M : J. Pharmacol. Exp. Ther., 302, 95 (2002)
- 18) Sutherland RJ, Hoising JM, Whishaw IQ : Neurosci. Lett., 120, 221 (1990)
- 19) Kuhlmann AC, Guilarte TR : Brain Res., 751, 281 (1997)
- 20) Clayton EC, Peng Y-G, Means LW, Ramsdell JS : Toxicon, 37, 1025 (1999)
- 21) 上野健一, 田沢悌二郎, 石下真通, 堀 義宏 : 道衛研所報, 51, 87 (2001)
- 22) 上野健一 : 道衛研所報, 54, 69 (2004)
- 23) Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN : Psychopharmacology, 94, 491 (1988)
- 24) 吉村 功 : 毒性・薬効データの統計解析, サイエンス・ト社, 東京, 1987, p.61
- 25) Shimohama S, Greenwald DL, Shafron DH, Akaike A, Maeda T, Kaneko S, Kimura J, Simpkins CE, Day AL, Meyer EM : Brain Res., 779, 359 (1998)
- 26) Kaneko S, Maeda T, Kume T, Kochiyama H, Akaike A, Shimohama S, Kimura J : Brain Res., 765, 135 (1997)
- 27) Hunter BE, de Fiebre CM, Papke RL, Kem WR, Meyer EM : Neurosci. Lett., 168, 130 (1994)
- 28) Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA : Nature, 383, 713 (1996)
- 29) Wonnacott S : Trends Neurosci., 20, 92 (1997)